

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Andrea Plec

6714/BT

**ODREĐIVANJE PREŽIVLJAVANJA PROBIOTIČKIH SOJEVA
BAKTERIJA *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* Bb12 i
Lactobacillus plantarum D13 IMOBILIZIRANIH U
HIDROKSIETIL CELULOZNOM GELU**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Personalizirani probiotički pripravci

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Antonio Starčević

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Kabinet za bioinformatiku**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

**ODREĐIVANJE PREŽIVLJAVANJA PROBIOTIČKIH SOJEVA BAKTERIJA
Bifidobacterium animalis subs. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13
IMOBILIZIRANIH U HIDROKSJETIL CELULOZNOM GELU**

Andrea Plec, 0058203485

Sažetak: Mikrobiota je mikrobna flora prisutna u i na ljudskom organizmu. Neravnoteža crijevne mikrobiote povezuje se s mnogim bolestima poput upalnih crijevnih bolesti, dijabetesa i raka, ali i pretilosti. Budući da su za zdrav mikrobiom zaslužni različiti mikroorganizmi kod različitih domaćina, za uravnoteženje crijevne mikrobiote koriste se raznovrsni probiotički pripravci. Probiotici su živi mikroorganizmi koji se primjenjuju kako bi donijeli zdravstvenu korist domaćinu, a za njihovo djelovanje postoji nekoliko predloženih mehanizama. Međutim, kako bi probiotici mogli djelovati potrebno je osigurati da živi dospiju u crijeva. U ovom radu ispitano je preživljavanje stanica dva probiotička soja, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13, imobilizirana u hidroksietil celuloznom gelu. Nakon 30 dana držanja u gelu pokazalo se kako hidroksietil celulozni gel nije pogodno sredstvo za imobilizaciju i čuvanje ovih probiotičkih sojeva.

Ključne riječi: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12; hidroksietil celulozni gel;
Lactobacillus plantarum D13; mikrobiota; probiotici

Rad sadrži: 31 stranica, 7 slika, 5 tablica, 66 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Antonio Starčević

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Jurica Žučko, doc. dr. sc. Ksenija Uroić, dr. sc. Damir Oros

Datum obrane: 18. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Section for Bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

DETERMINING SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIAL STRAINS
***Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus plantarum* D13**
IMMOBILIZED IN HYDROXYETHYL CELLULOSE GEL

Andrea Plec, 0058203485

Abstract: Microbiota is the microbial flora present in and on the human organism. Dysbiosis of the intestinal microbiota is associated with many diseases, such as inflammatory bowel disease, diabetes, cancer and obesity. Since a healthy microbiome consists of different microorganisms in different hosts, various probiotic formulas are used to restore the balance of the intestinal microbiota. Probiotics are live microorganisms which confer a health benefit on the host, with several proposed mechanisms of action. However, in order for probiotics to work, it's necessary to ensure that they arrive in the gut alive. The aim of this work was to test the survival of two probiotic strains, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus plantarum* D13, which were immobilized in hydroxyethyl cellulose gel. After 30 days of preservation it was concluded that hydroxyethyl cellulose gel isn't suitable for immobilization and preservation of mentioned probiotic strains.

Keywords: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12; hydroxyethyl cellulose gel;
Lactobacillus plantarum D13; microbiote; probiotics

Thesis contains: 31 pages, 7 figures, 5 tables, 66 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Antonio Starčević, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance: Jurica Žučko, PhD; Ksenija Uroić, PhD; Damir Oros, PhD

Defence date: September 18th, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKROBIOTA	2
2.1.1. Gastrointestinalna mikrobiota	2
2.1.2. Disbioza mikrobiote	3
2.2. PROBIOTICI	4
2.2.1. Definicija probiotika	4
2.2.2. Probiotički sojevi	5
2.2.2.1. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	6
2.2.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> D13	6
2.2.3. Mehanizmi djelovanja probiotika	7
2.2.3.1. <i>Direktni antagonizam</i>	8
2.2.3.2. <i>Kompetitivna ekskluzija</i>	8
2.2.3.3. <i>Stimulacija imunološkog odgovora</i>	9
2.2.3.4. <i>Konkurencija za nutrijente</i>	9
2.2.3.5. <i>Biosinteza vitamina</i>	9
2.3. GEL	10
2.3.1. Hidrogelovi za imobilizaciju stanica	10
2.3.2. Celulozni polimeri	11
2.3.2.1. <i>Hidroksietil celuloza</i>	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Mikroorganizmi	12
3.1.2. Kemikalije	12
3.1.3. Podloge za mikroorganizme	12
3.1.4. Pribor	14
3.1.5. Aparatura	14
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Priprema i odabir gela	15
3.2.2. Priprema kultura bakterija	17
3.2.3. Nacjepljivanje bakterija u gel	18
3.2.4. Određivanje broja preživjelih bakterija	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČCI	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Ljudski gastrointestinalni trakt podrazumijeva nekoliko povezanih organa od usta do crijeva. U njima postoji kompleksna mikroflora koja se uobičajeno sastoji od fakultativnih i striktnih anaeroba, što uključuje kvasce i bakterijske rodove *Streptococcus*, *Bacteroides* i *Lactobacillus* (Nobre Costa i Miglioranza, 2012). Mikrobna zajednica u tim organima nazvana je gastrointestinalnom mikrobiotom, a sastoji se od mnoštva mikrobnih stanica za koje se pretpostavlja da brojem barem deset puta nadmašuju broj stanica ljudskog tijela (Zoetendal i sur., 2008), no točan broj se još uvijek istražuje. Početkom 20. stoljeća, Elie Metchnikoff razvio je teoriju o tome kako su bakterije truljenja u crijevima zaslužne za razvoj bolesti i skraćenje života čovjeka zbog toksina koje proizvode. Smatrao je kako konzumacija jogurta može dovesti do zamjene tih štetnih bakterija u crijevima s korisnim bakterijama, što bi posljedično dovelo i do poboljšanja zdravlja i produženja života čovjeka (Metchnikoff, 1907). To je prvi značajan pokušaj manipulacije crijevnom mikroflorom. Međutim, tek je u drugoj polovici 20. stoljeća potvrđeno kako zaista postoje bakterije koje imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi i životinja kad se unesu u gastrointestinalni trakt, a nazvane su probioticima (Havenaar i Huis in't Veld, 1992; Lilly i Stillwell, 1965). Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako probiotici imaju pozitivno zdravstveno djelovanje na gastrointestinalne infekcije, antimikrobnu aktivnost, poboljšanje metabolizma laktoze, smanjenje kolesterola, stimulaciju imunološkog sustava, antimutagena svojstva, antitumorska svojstva, sprječavanje dijareje i supresiju infekcije s *Helicobacter pylori* (Chávári i sur., 2012; Sanders i sur., 2007; Shah, 2007). Posljednjih par desetljeća su se uz konzumaciju fermentiranih mliječnih proizvoda i fermentiranog povrća počeli upotrebljavati probiotički dodaci prehrani (Hawrelak, 2013). No blagotvorni učinci probiotičkih sojeva javljaju se tek kad dovoljan broj živih stanica stigne u crijeva, što znači da prvo moraju preživjeti teške uvjete u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta (Gilliland, 1989). S obzirom da se nakon konzumacije probiotici u crijevima domaćina zadržavaju samo kratak period, potrebno je pronaći optimalno rješenje za unos probiotika u organizam (Sanders, 2008). Postoje mnoge metode stabilizacije (Goderska, 2012) i inkapsulacije probiotika kako bi se zaštitili tijekom transporta kroz gastrointestinalni sustav (Chávári i sur., 2012).

U ovom radu je ispitana mogućnost korištenja hidroksietil celuloznog gela kao medija za čuvanje i korištenje probiotičkih sojeva. Pripremljen je i izabran hidroksietil celulozni gel odgovarajuće konzistencije, te je u tom gelu ispitivano preživljavanje dva probiotička soja, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13, na sobnoj temperaturi i pri čuvanju na 4°C u hladnjaku.

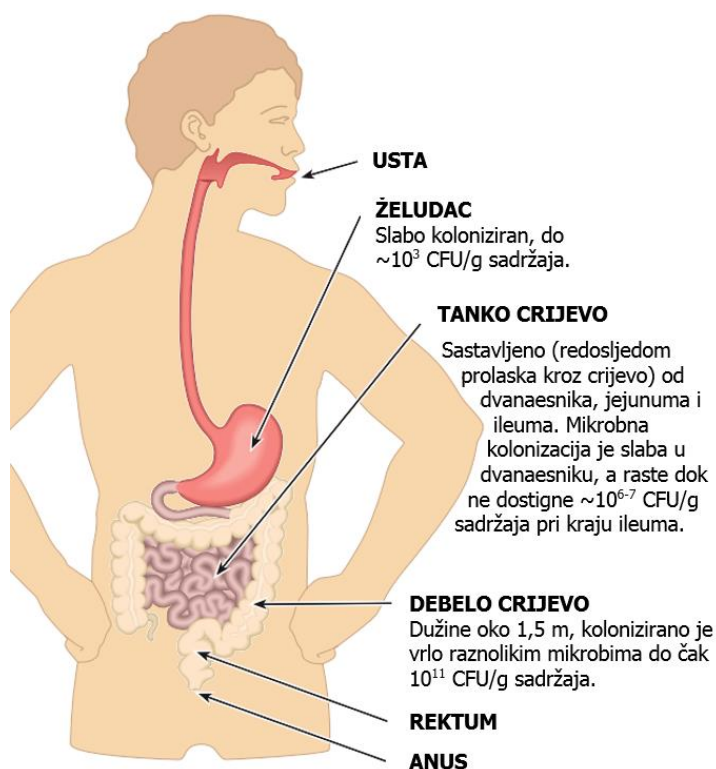
2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROBIOTA

2.1.1. Gastrointestinalna mikrobiota

Mikrobiota je naziv za mikrobnu floru koja je prirodno prisutna u i na ljudskom organizmu i sastoji se od bakterija, jednostaničnih gljiva, virusa i arheja, pri čemu se broj stanica pojedinih vrsta i vrste mikroorganizama razlikuju od domaćina do domaćina (Lloyd-Price i sur., 2016; Grice i Segre, 2012). Mikroorganizmi se nalaze u nekoliko regija ljudskog tijela, uključujući kožu, urogenitalni i gastrointestinalni trakt, pri čemu najviše koloniziraju tanko i debelo crijevo, a slabije želudac zbog niske pH vrijednosti (slika 1).

Za direktno određivanje DNA sadržaja mikrobni uzoraka koriste se tehnike neovisne o kulturama, poput DNA sekvencioniranja i fluorescentne *in situ* hibridizacije. Korištenjem fluorescentne *in situ* hibridizacije ciljane na 16S ribosomalni RNA gen pokazano je da dvije trećine intestinalnih bakterija stanovništva zapadne Europe pripada rodovima *Bacterioides*, *Clostridium*, *Streptococcus* i *Lactococcus*, i vrsti *Eubacterium rectale* (Franks i sur., 1998). U novijem su istraživanju u Belgiji ciljanim sekvencioniranjem gena 16S ribosomalne RNA dobiveni opširniji podaci o sastavu gastrointestinalne mikrobiote stanovništva. Prema tim podacima u mikrobioti su najzastupljenije bakterije iz rodova *Bacterioides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Alistipes*, *Coprococcus* i *Bifidobacterium*, i neklasificirani rodovi porodica *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* (Falony i sur., 2016).



Slika 1: Kolonizacija mikrobni stanica u ljudskom gastrointestinalnom traktu.

(prema Sanders i sur., 2007)

Teško je točno odrediti stvaran sastav crijevne mikrobiote, s obzirom da se fekalna mikrobiota razlikuje od crijevne mikrobiote (Eckburg i sur., 2005), no vrše se sekvencioniranja uzoraka raznih dijelova gastrointestinalnog trakta kako bi se odredio mikrobiom domaćina. Mikrobiom je naziv za kompletan genetički materijal mikrobiote određen sekvencioniranjem (Grice i Sagre, 2012). Internacionalna istraživanja pokazala su kako geografija ima velik utjecaj na varijacije u mikrobiomu populacije, uključujući razlike između Sjeverne i Južne Amerike i Afrike (Yatsunenko i sur., 2012), Europe i Afrike (De Filippo i sur., 2010), Koreje i Japana (Takeshita i sur., 2014), te između ruralne i urbane populacije Rusije (Tyakht i sur., 2013) i Kine (Zhang i sur., 2015). Prema tome, nije pravilno definirati "zdrav" mikrobiom kao idealan set specifičnih mikroorganizama. Predloženo objašnjenje zdravog mikrobioma je kako je to funkcionalna jezgra u kojoj mikrobiom na određenim staništima provodi komplementarne metaboličke i druge molekularne funkcije, no za to mogu biti zaslužni različiti mikroorganizmi kod različitih ljudi (Shafquat i sur., 2014).

2.1.2. Disbioza mikrobiote

Već se tisućama godina proizvodi i konzumira fermentirana hrana poput jogurta, kefira i kiselog kupusa, koja sadrži mikrobne kulture. Hrana dobivena mliječno kiselom fermentacijom dugo je vremena imala značajan udio u prehrani ljudi, a u zemljama u razvoju još uvijek ima, s obzirom da je to često najjednostavniji i najsigurniji način za konzerviranje hrane. Moguće je kako je ljudski gastrointestinalni trakt sa stoljećima takve prehrane evoluirao i prilagodio se dnevnom unosu živih bakterija mliječne kiseline. Međutim, tijekom 20. stoljeća je uz industrijalizaciju došlo i do gubitka takvog načina prehrane u razvijenim zemljama, što je potencijalan uzrok gastrointestinalnih i imunoloških problema njihove današnje populacije (Molin, 2001; Hawrelak, 2013). Disbioza, odnosno neravnoteža crijevne mikroflore, povezuje se s mnogim bolestima poput upalnih crijevnih bolesti, multiple skleroze, dijabetesa tipa 1 i 2, alergija, astme i raka (Lloyd-Price i sur., 2016; Garrett, 2015; Peterson i Round, 2014; Backhed i sur., 2012). Uz sve ove bolesti problem je počela predstavljati i pretilost, posebice u zapadnjačkim zemljama svijeta. Pretilost nije samo estetski problem, već se povezuje s bolestima poput dijabetesa tipa 2, hipertenzije i koronarne bolesti (Zhang i sur., 2016).

Uravnoteženje mikrobiote nužno je za održavanje zdravlja gastrointestinalnog trakta i općeg zdravlja domaćina, te predstavlja način rješavanja svih navedenih problema uzrokovanih disbiozom (Rolfe, 2000). Istraživanja su pokazala kako konzumacija probiotika radi uravnoteženja crijevne mikroflore ima pozitivan utjecaj na smanjenje težine i indeksa tjelesne mase, što posljedično utječe i na poboljšanje drugih navedenih bolesti (Zhang i sur., 2016).

2.2. PROBIOTICI

2.2.1. Definicija probiotika

Neki mikroorganizmi tijekom rasta proizvode antibiotike, tvari koje inhibiraju rast drugih mikroorganizama na istoj podlozi. Međutim, određeni mikroorganizmi umjesto inhibitornog djelovanja imaju stimulirajuće djelovanje na rast drugih mikroorganizama. Pojam "probiotik" izveden je iz grčkog jezika i doslovno preveden znači "za život". Prvi put su ga upotrijebili Lilly i Stillwell 1965. godine kako bi opisali tvari koje neki mikroorganizam izlučuje, a koje imaju stimulirajući učinak na rast nekog drugog mikroorganizma koji se nalazi na istoj hranjivoj podlozi (Lilly i Stillwell, 1965).

Parker je 1974. godine izmijenio definiciju probiotika kako bi opisivala tvari i organizme koji doprinose ravnoteži crijevne mikroflore (Parker, 1974). Fuller je 1989. godine definirao probiotike kao: "Živo mikrobno hranjivo koje korisno djeluje na životinjski organizam, poboljšavajući ravnotežu njegove crijevne mikroflore" (Fuller, 1989). Definiciju su 1992. godine proširili Havenaar i Huis in't Veld u sljedeću: "Probiotik je jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni kod životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina tako što mu poboljšavaju svojstva autohtone mikroflore". Takva definicija obuhvaća samo žive organizme koji mogu poboljšati zdravlje ljudi i životinja, a imaju efekt u ustima, gornjem respiratornom traktu, gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu domaćina (Havenaar i Huis in't Veld, 1992).

Trenutna definicija probiotika, koju su odredile Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih Naroda (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO – World Health Organization), glasi: "Probiotici su živi mikroorganizmi koji primijenjeni u adekvatnim količinama donose zdravstvenu korist domaćinu" (Khalighi i sur., 2016). Premda neki mehanizmi djelovanja probiotika, poput dopreme određenih enzima koji su potrebni u crijevima, ne zahtijevaju nužno žive stanice – mrtve mikrobne stanice nisu i ne mogu biti probiotici (Sanders, 2008). Međutim, probiotičkim sojevima u probavnom sustavu prepreku predstavljaju želučana kiselina, enzimi koji među ostalim mogu uzrokovati i lizu bakterija, te konjugirane i nekonjugirane žučne soli (Šušćević i sur., 1998). Iz tog razloga je potrebno pronaći načine očuvanja što većeg broja probiotičkih stanica živima, kako bi mogle ispuniti sve svoje uloge nakon unošenja u organizam.

2.2.2. Probiotski sojevi

Najčešći probiotički mikroorganizmi su iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Saccharomyces*. Iz roda *Lactobacillus* najčešće su vrste: *acidophilus*, *plantarum*, *ramnosus*, *paracasei*, *fermentum*, *reuteri*, *johnsonii*, *brevis*, *casei*, *lactis*, *delbrueckii* i *gasseri*. Iz roda *Bifidobacterium* najviše su korištene vrste: *breve*, *infantis*, *longum*, *bifidum*, *thermophilum*, *adolescentis*, *animalis* i *lactis*. Od preostalih rodova česta je samo po jedna vrsta, pa su to *Bacillus coagulans*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* i *Saccharomyces cerevisiae* (Hawrelak, 2013; Goldin, 1998; Macfarlane i Cumming, 1999). Da bi se neki mikroorganizam koristio kao učinkovit probiotik mora zadovoljavati određene karakteristike kako bi bio sposoban postići maksimalan terapijski efekt (tablica 1). Ukoliko probiotik ne zadovoljava sve karakteristike neće biti ni približno učinkovit kao probiotici koji ih zadovoljavaju sve (Hawrelak, 2013).

Tablica 1: Poželjne karakteristike probiotika. Moraju zadovoljavati karakteristike označene (*) zvjezdicom kako bi imali terapijski učinak (prema Hawrelak, 2013).

KARAKTERISTIKE	FUNKCIONALNOST
ljudsko podrijetlo	<i>Sposobnost preživljavanja u uvjetima ljudskog GI trakta, uz mogućnost vrsno-specifičnih zdravstvenih učinaka.</i>
* stabilnost u želučanoj kiselini i žučnim solima	<i>Sposobnost preživljavanja kroz želudac i tanko crijevo.</i>
* adhezija na crijevnu sluznicu	<i>Vjeruje se kako je nužno za imunomodulaciju i kompetitivnu inhibiciju patogenih organizama.</i>
* kolonizacija intestinalnog trakta	<i>Razmnožavanje u crijevima znači kako dnevna konzumacija nije nužno potrebna. Uloga u imunomodulaciji.</i>
klinička sigurnost i sigurnost u hrani	<i>Ne smije biti štetnih učinaka ili moraju biti minimalni. Uz to je potrebna točna identifikacija roda, vrste i soja.</i>
proizvodnja antimikrobnih tvari	<i>Normalizacija gastrointestinalne flore uz potisnut rast patogenih organizama.</i>
antagonizam prema patogenim organizmima	<i>Sprječavanje adhezije i proizvodnje toksina patogena.</i>
klinički dokumentiran i potvrđen zdravstveni učinak	<i>Klinički potvrđeni zdravstveni učinci te određena minimalna efektivna doza u različitim formulacijama.</i>

Skoro svi probiotički sojevi spadaju u grupu bakterija mliječne kiseline. To su gram-pozitivne nesporigene fermentativne bakterije koje rastu u anaerobnim uvjetima (Holzapfel i sur., 2001).

2.2.2.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12

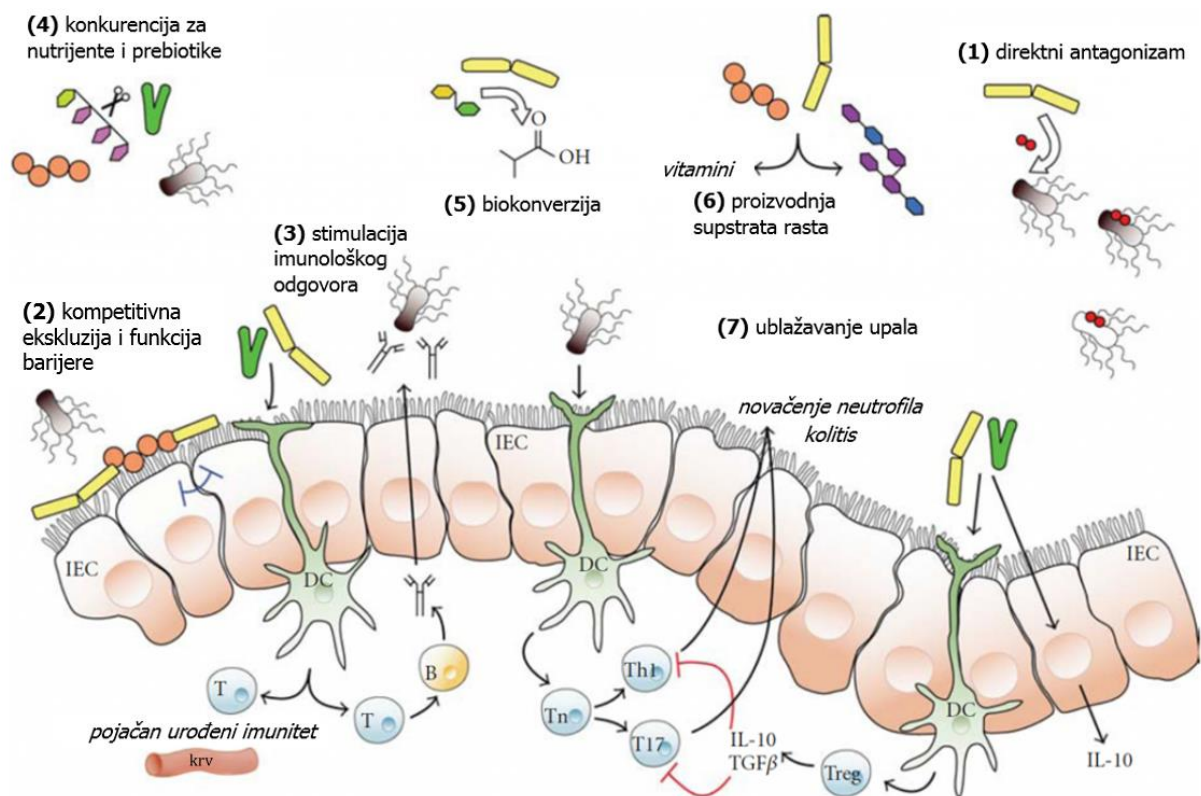
Često se za upotrebu kod ljudi preporučaju probiotici koji su ljudskog podrijetla, odnosno koji se prirodno mogu naći u ljudskoj mikrobioti. Međutim, neki sojevi koji nisu izolirani iz ljudi pokazali su se kao učinkoviti probiotici. Jedni od takvih probiotika su sojevi bakterije *Bifidobacterium animalis*. Bakterije roda *Bifidobacterium* već se dugo konzumiraju kao dio hrane i kao dodatak prehrani, te nisu zabilježene nikakve kliničke infekcije vrstama koje se koriste kao probiotici (Sanders, 2006). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 je probiotički soj koji je pokazao dobru otpornost na želučanu kiselinu (pH 2) i žučne soli, te postiže zadovoljavajuću kolonizaciju u crijevima (Savard i sur., 2011; Solano-Aguilar i sur., 2008).

2.2.2.2. *Lactobacillus plantarum* D13

Najveća grupa bakterija mliječne kiseline pripada rodu *Lactobacillus* koji sadrži više od 50 različitih vrsta. Od tih vrsta samo neke imaju sojeve koji sudjeluju u fermentaciji hrane i uz to se prirodno nalaze u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Jedna od takvih bakterija je *Lactobacillus plantarum*, koja je među ostalim pokazala značajnu otpornost na želučanu kiselinu (pH 2) i žučne soli prilikom prolaska kroz probavni sustav, te zadovoljavajuću sposobnost kolonizacije crijeva (de Vries i sur., 2006).

2.2.3. Mehanizmi djelovanja probiotika

Mehanizmi djelovanja probiotika nisu u potpunosti istraženi i dokumentirani, no postoji nekoliko poznatih i predloženih mehanizama (slika 2) koji objašnjavaju djelovanje probiotičkih sojeva na poboljšanje zdravlja domaćina (Khalighi i sur., 2016; Rolfe, 2000; Fuller, 1991). Poteškoću pri određivanju mehanizama djelovanja pojedinih probiotičkih sojeva predstavlja to što se drugačije ponašaju *in vivo* nego tijekom istraživanja *in vitro* (Ibnou-Zekri i sur., 2003).



Slika 2: Shematski prikaz potencijalnih i poznatih mehanizama djelovanja probiotika na mikrobiotu. Ovi mehanizmi uključuju: (1) direktni antagonizam proizvodnjom bakteriocina i drugih antimikrobnih tvari; (2) kompetitivnu ekskluziju na receptorima za adheziju i poboljšanu funkciju barijere; (3) stimulaciju urođenog imunološkog odgovora; (4) konkurenciju za korištenje nutrijenata i prebiotika; (5) biokonverzija molekula u produkte fermentacije s inhibitornim svojstvima; (6) proizvodnja supstrata rasta, kao što su egzopolisaharidi i vitamini, za druge bakterije; (7) ublažavanje upala, čime se mijenjaju svojstva u crijevu za kolonizaciju i zadržavanje. IEC – unutrašnje epitelne stanice, DC – dendritičke stanice, T – T-stanice.

(prema Khalighi i sur., 2016)

2.2.3.1. Direktni antagonizam

Jedan od mehanizama je proizvodnja inhibitornih, odnosno antimikrobnih tvari kao što su: organske kiseline, vodikov peroksid, ugljikov dioksid, diacetil, acetaldehid, kratkolančane masne kiseline, bakteriocini i bakteriocinima slični inhibitorni spojevi (Fijan, 2016; Hawrelak, 2013). Tvari koje proizvode probiotički sojevi mogu djelovati na smanjenje broja okolnih živih stanica, ali i utjecati na metabolizam tih stanica i njihovu proizvodnju toksina. Time se modificira mikroflora i značajno smanjuje utjecaj bakterija koje su nepoželjne u crijevima na zdravlje domaćina (Khaligali i sur., 2016; Rolfe, 2000; Fuller, 1991). Istraživanjem je dokazano kako je postizanjem definirane mikroflore moguće zaštititi pokusne miševe od kolitisa kada su izloženi patogenom soju bakterije *Clostridium difficile*, što ide u prilog mehanizmu sprječavanja proizvodnje toksina patogenih bakterija (Wilson i sur., 1988).

Bakterije mliječne kiseline proizvode mnogo različitih bakteriocina koji zbog svoje raznovrsne kemijske strukture mogu djelovati na različite funkcije mikrobnih stanica, uključujući transkripciju, translaciju i replikaciju, ali i stvarati pore ili kanale u membranama što dovodi do smrti stanica (Oscariz i Pisabarro, 2001). Najčešće proizvedeni bakteriocini su lakticin, laktocin, pediocin, pisciolin, enterocin, reuterin, plantaricin, enterolizin i nisin (Arqués i sur., 2015; Šušković i sur., 2010). Međutim, djelotvorni su uglavnom samo protiv gram-pozitivnih bakterija (Parada i sur., 2007). Uz to, bakterije mliječne kiseline najčešće proizvode mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, mravlju kiselinu i benzojevu kiselinu, koje zakiseljavaju okoliš i čine ga nepogodnim za rast drugih mikroorganizama (Fijan, 2016). Mnoge od navedenih tvari koje proizvode probiotički sojevi imaju prilično nespecifičnu aktivnost, što može negativno utjecati i na poželjne bakterije u crijevima (Hawrelak, 2013).

2.2.3.2. Kompetitivna ekskluzija

Blokiranje mjesta za adheziju bakterija na epitelnoj površini crijeva kompetitivnom inhibicijom još je jedan od mehanizama djelovanja probiotika. Mnogo crijevnih patogenih bakterija ne može kolonizirati crijeva ukoliko nema mjesta za adheziju, pa se posljedično smanjuje njihova mogućnost da uzrokuju bolesti (Rolfe, 2000; Fuller, 1991). Znanstvenici su mogućnost ovakvog mehanizma djelovanja pokazali kad su pokusne svinje prethodno tretirane nepatogenim sojem *E. coli* bile otpornije na patogeni soj od kontrolne grupe koja nije prethodno tretirana nepatogenim sojem, pa je zaključeno kako se ti sojevi *E. coli* u crijevima vežu na iste receptore (Davidson i Hirsh, 1976). *In vitro* istraživanjem adhezije dva soja *E. coli* dokazano je kako adhezija nije moguća uz prisutnost *Lactobacillus plantarum* 299v, te je zaključeno da *L. plantarum* potiče izlučivanje mucina iz crijevnih epitelnih stanica, što onemogućuje adheziju *E. coli* (Mack i sur., 1999).

2.2.3.3. Stimulacija imunološkog odgovora

Još jedan važan mehanizam djelovanja probiotika je stimulacija imunološkog odgovora (Hawrelak, 2013; Perdigon i sur., 1995), koji se može javiti u obliku pojačanog izlučivanja imunoglobulina A (IgA) (Link-Amster i sur., 1994), povećane fagocitotne aktivnosti makrofaga (Schriffin i sur., 1995), povišenog broja prirodnih stanica ubojica, T stanica i interferona (Fuller i Gibson, 1997). Istraživanje je potvrdilo kako je s dnevnom konzumacijom pripravka koji je sadržavao *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (u tadašnjoj nomenklaturi *Bifidobacterium lactis* Bb12) kod zdrave djece došlo do pojačanog izlučivanja IgA, iako ne postoje dokazi kako je probiotik stimulirao to izlučivanje (Fukushima i sur., 1998).

2.2.3.4. Konkurencija za nutrijente

Zadnji predloženi mehanizam djelovanja probiotika protiv neželjenih mikroorganizama je konkurencija za nutrijente, unatoč tome što je u probavnom sustavu najveća koncentracija nutrijenata u organizmu. Dovoljan je manjak samo jednog limitirajućeg nutrijenta kako bi se spriječio rast nekog patogenog mikroorganizma u crijevima (Fuller, 1991). Međutim, za ovakav mehanizam djelovanja još uvijek nema dovoljno dokaza.

2.2.3.5. Biosinteza vitamina

Određeni sojevi probiotičkih bakterija imaju sposobnost biosinteze vitamina, koji su esencijalni za normalno funkcioniranje ljudskog i životinjskog organizma. Vitamini topljivi u vodi uglavnom djeluju kao koenzimi u važnim biokemijskim reakcijama, dok su vitamini topljivi u mastima najčešće važne komponente u staničnim membranama. S obzirom da ljudski organizam ne može samostalno sintetizirati većinu vitamina, upotreba sojeva probiotika koji imaju tu sposobnost predstavlja prirodniju alternativu kemijski sintetiziranim vitaminskim dodacima prehrani (Gu i Li, 2016).

2.3. GEL

2.3.1. Hidrogelovi za imobilizaciju stanica

Hidrogelovi su polimeri umreženi pomoću ionskih interakcija, hidrofobnih interakcija, fizikalnih veza, kemijskih veza ili vodikovih veza. Mogu biti sintetski ili prirodni, a sposobni su nabubriti i zadržati veliku količinu vode unutar svoje trodimenzionalne strukture (Ahmed, 2015; Jen i sur., 1995). Zbog velike količine vode koju mogu prihvatiti kompatibilni su s ljudskim tkivom, kao na primjer s kožom, očima i unutrašnjim organima (Petrovčić i Pilipović, 2011). Korištenje hidrogelova za dostavu lijekova u organizam uključuju mogućnost sporog otpuštanja, što dovodi do održavanja visoke lokalne koncentracije lijeka tijekom dužeg perioda (Onofrei i Filimon, 2016).

Hidrogelovi u farmaceutskoj industriji imaju nekoliko različitih primjena (Rathod i Mehta, 2015):

- sustavi za neprekidno otpuštanje lijeka
- rektalna doprema lijeka
- oblaganje posuda za uzgoj kultura stanica
- detektori osjetljivosti okoline
- kontaktne leće (silicijev hidrogel, poliakrilamidi)
- EKG medicinske elektrode
- prekrivanje rana.

Zbog svoje umrežene strukture hidrogelovi se mogu koristiti za imobilizaciju i transport stanica, no potrebno je paziti da omogućavaju zadovoljavajuću difuziju i transport kisika, nutrijenata, metaboličkog otpada i produkata metabolizma (Jen i sur., 1995). Međutim, materijali koji se koriste kao sredstvo za imobilizaciju moraju pokazivati kemijsku, fizikalnu i biološku stabilnost tijekom obrade i u reakcijskim uvjetima, a ne smiju biti toksični ni za imobilizirane stanice ni krajnjeg korisnika (Mitropoulou i sur., 2013).

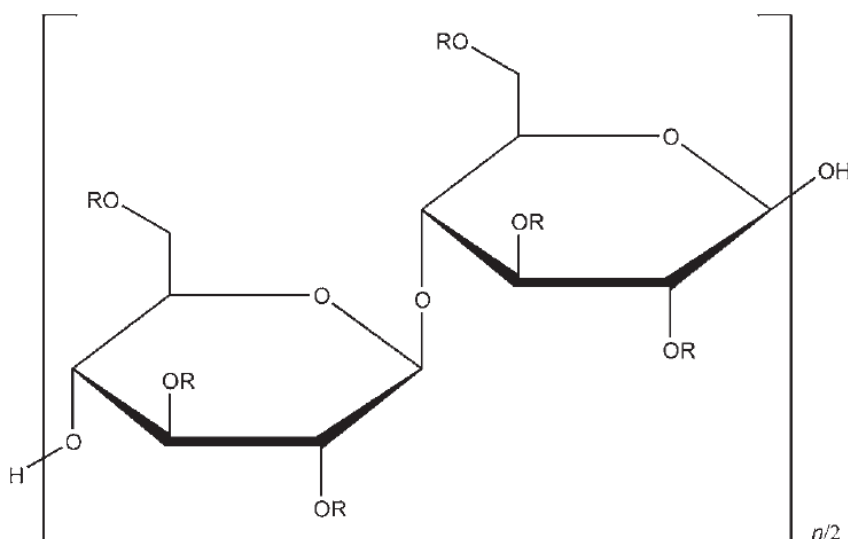
Najkorisnija upotreba tehnologije imobilizacije mikrobnih stanica je kontrolirana i kontinuirana dostava probiotika u želudac i crijeva. Na taj način bi se mogla održavati veća viabilnost stanica u crijevima usprkos želučanoj kiselini (Mitropoulou i sur., 2013).

2.3.2. Celulozni polimeri

Hidrogelovi dobiveni od prirodnih polimera, pogotovo polisaharidni, vrlo su zanimljivi materijali s obzirom da se mogu primjenjivati u mnogo različitih područja. Priprema takvih gelova je ekološki prihvatljiva, a sirovine su jeftine i dolaze iz obnovljivih izvora. Među takvim polisaharidnim gelovima celuloza je najdostupnija s obzirom da je ima u izobilju, a pokazuje dobru kombinaciju hidrofobnosti i mehaničkih svojstava (Navarra i sur., 2015). Oba svojstva su rezultat mnogobrojnih hidroksilnih grupa koje stvaraju vodikove veze s vodom ili hidroksilnim grupama susjednih polimernih lanaca. Vodikove veze među hidroksilnim grupama pridonose mehaničkoj jačini celulozne strukture te njenoj netopljivosti u vodi i većini organskih otapala (Klemm i sur., 1998).

2.3.2.1. Hidroksietil celuloza

Hidroksietil celuloza je neionski polimer (slika 3) koji se koristi u širokom rasponu farmaceutskih proizvoda kao agens za zgušnjavanje, vezivno sredstvo u tabletama i sredstvo za oblaganje tableta filmom. Topljiva je u vodi te formira bezbojne jednolične otopine, dok je u organskim otapalima praktički netopljiva (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009).



Slika 3: Strukturna formula hidroksietil celuloze, u kojoj R može predstavljati H ili $[-CH_2CH_2O-]_mH$, gdje je m zajednički integralni broj celuloznih derivata.

(Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Za određivanje preživljavanja probiotičkih sojeva bakterija u hidroksietil celuloznom gelu upotrijebljene su bakterijske kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13, dobivene iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura pri Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Kemikalije

- hidroksietil celuloza (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Rhingerova otopina (Rhinger tablete, Merck, Njemačka)
- fiziološka otopina
- mupirocin (Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.1.3. Podloge za uzgoj mikroorganizama

1) MRS bujon (Liofilchem, Italija)

Za uzgoj prekonocnih kultura bakterija korišten je MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) bujon pH vrijednosti $6,2 \pm 0,2$ kao selektivni bujon za bakterije rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Prethodno je steriliziran pri 121°C kroz 15 minuta. Sastav MRS bujona:

- amonijev citrat, 2 g/L
- dikalijev hidrogenfosfat, 2 g/L
- glukoza, 20 g/L
- kvašćev ekstrakt, 5 g/L
- magnezijev sulfat, 0,2 g/L
- manganov sulfat, 0,05 g/L
- mesni ekstrakt, 10 g/L
- natrijev acetat, 5 g/L
- pepton, 10 g/L.

2) MRS agar (Biolife, Italija)

Za uzgoj *Lactobacillus plantarum* D13 iz uzorka prethodno naciepljenog hidroksietil celuloznog gela korišten je MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar pH vrijednosti $6,5 \pm 0,2$. Prethodno je steriliziran pri 121°C kroz 15 minuta. Sastav MRS agara:

- agar, 15 g/L
- diamonijev citrat, 2 g/L
- dikalijev hidrogenfosfat, 2 g/L
- glukoza, 20 g/L
- kvašćev ekstrakt, 5 g/L
- magnezijev sulfat, 0,2 g/L
- manganov sulfat, 0,05 g/L
- mesni ekstrakt, 10 g/L
- natrijev acetat, 5 g/L
- pepton, 10 g/L
- Tween[®] 80, 1 g/L.

3) TOS agar (Sigma, SAD)

Za selektivni uzgoj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 iz uzorka prethodno naciepljenog hidroksietil celuloznog gela korišten je TOS (transgalaktozilirani oligosaharidi) agar s dodanim mupirocinom. Mupirocin je suspendiran u sterilnoj destiliranoj vodi te je dodan neposredno prije izlivanja otopljene temperirane hranjive podloge. Dodaje se 25 mL suspenzije mupirocina za svakih 600 mL TOS agara. Sastav TOS agara:

- agar, 15 g/L
- amonijev sulfat, 3 g/L
- dikalijev hidrogenfosfat, 4,8 g/L
- enzimski hidrolizat kazeina, 10 g/L
- galaktooligosaharid, 10 g/L
- kalijev dihidrogenfosfat, 3 g/L
- kvašćev ekstrakt, 1 g/L
- L-cistein hidroklorid monohidrat, 0,5 g/L
- magnezijev sulfat heptahidrat, 0,2 g/L
- natrijev propionat, 15 g/L.

Za svako određivanje broja preživjelih bakterija bilo je potrebno pripremiti oko 600 mL MRS agara i 600 mL TOS agara.

3.1.4. Pribor

- pipete 0,5-5 mL (Eppendorf Research Plus) sa sterilnim nastavcima
- pipete 1-10 mL (Eppendorf Research Plus) sa sterilnim nastavcima
- laboratorijske čaše od 100 i 250 mL
- Erlenmeyer tikvice od 100 i 250 mL
- plastične kivete s čepom od 10 i 50 mL
- Petrijeve zdjelice \varnothing 90 mm
- štapić po Drigalskom
- menzura od 100 mL
- stakleni štapić
- metalna špatula
- križni magnet za miješanje dužine 2,5 cm
- ravni magnet za miješanje dužine 4 cm

3.1.5. Aparatura

- analitička vaga (Adam Eclipse)
- magnetska miješalica s grijanjem (IKA RCT basic)
- laboratorijska miješalica (IKA EUROSTAR 20 digital) s properelskim nastavkom
- centrifuga (Eppendorf 5804R, Njemačka)
- termostat (Biosan ES-20/60, Latvija)
- hladnjak (Gorenje, Slovenija)
- plamenik

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema i odabir gela

Kako bi se odabrao gel zadovoljavajuće konzistencije, prvo su u malom mjerilu u destiliranoj vodi pripremljeni hidroksietil celulozni gelovi koncentracija 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 35 g/L. Za pripremu svake koncentracije gela u laboratorijsku čašu od 100 mL dodano je 10 mL destilirane vode, a zatim i odgovarajuća masa hidroksietil celuloze prethodno izvagana na analitičkoj vagi (tablica 2).

Tablica 2: Izvagane mase hidroksietil celuloze i pripadajuće koncentracije gela

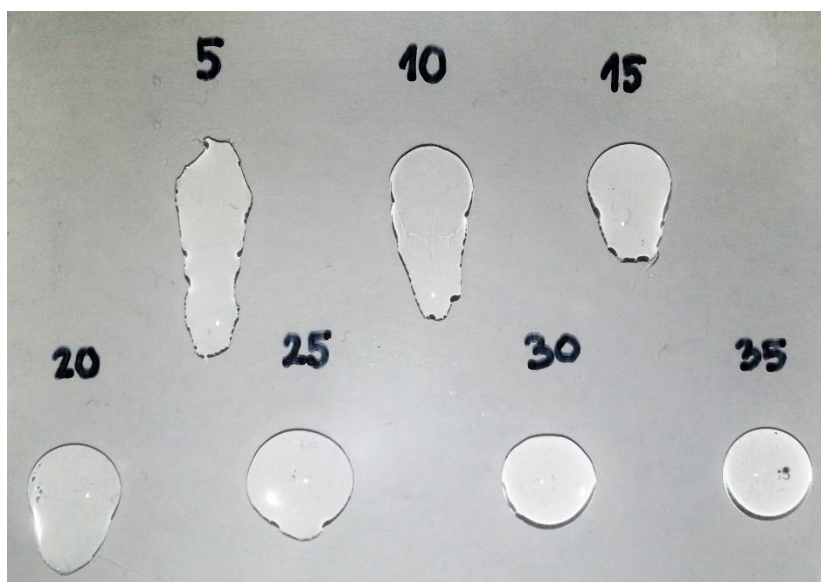
masa hidroksietil celuloze [g]	0,0500	0,1002	0,1501	0,2004	0,2502	0,3005	0,3506
koncentracija gela [g/L]	5,00	10,02	15,01	20,04	25,02	30,05	35,06

Budući da pri sobnoj temperaturi ne dolazi do otapanja hidroksietil celuloze u destiliranoj vodi, u čašu je dodan magnet te je čaša postavljena na magnetsku miješalicu s grijanjem. Temperatura i broj okretaja miješalice regulirani su ovisno o koncentraciji hidroksietil celuloznog gela koji je pripreman, s ciljem postizanja što bržeg otapanja. Za miješanje gela koncentracija 5 i 10 g/L korišten je križni magnet za miješanje, dok je za pripremu preostalih koncentracija korišten ravni magnet koji miješanjem pokriva cijelo dno laboratorijske čaše od 100 mL bez dodirivanja stijenki.

Za pripremu gelova koncentracija 5 i 10 g/L miješanje je započeto pri 500 rpm i 60°C. Tijekom par minuta došlo je do homogene raspodjele čestica hidroksietil celuloze u destiliranoj vodi, no nije došlo do otapanja. Daljnim povećanjem broja okretaja miješalice na 700 rpm te zagrijavanjem sljedećih 5 minuta došlo je do postupne hidratacije tih čestica. Po završetku miješanja hidroksietil celuloza se u potpunosti otopila u destiliranoj vodi dajući bistre, bezbojne otopine, bez značajne promjene viskoznosti. Otapanje gela koncentracije 15 g/L provedeno je pri 500 rpm i 60°C tijekom par minuta, a zatim je broj okretaja miješalice povećan na 700 rpm tijekom sljedećih 5 minuta. Međutim, pri ovoj koncentraciji nije došlo do otapanja svih čestica hidroksietil celuloze u destiliranoj vodi, pa je temperatura magnetske miješalice povišena na 80°C uz smanjenje broja okretaja na 600 rpm sljedećih 5 minuta. Dobivena je blago mutna, bezbojna otopina, a optičkim zapažanjem zaključeno je da je zanemarivo viskoznija od vode.

Otapanje gelova koncentracija 20 i 25 g/L odmah je započeto pri 600 rpm i 80°C, što se pokazalo kao dobra kombinacija za postizanje potpunog otapanja. Već nakon 5 minuta zagrijavanja došlo je do otapanja hidroksietil celuloze. Dobivene su blago mutne, bezbojne otopine s puno mjehurića zraka zarobljenih unutar strukture nastalog gela. S povećanjem koncentracije hidroksietil celuloze došlo je i do povećanja viskoznosti, no oba gela ostala su prilično tečna. Priprema gela s 30 g/L hidroksietil celuloze započeto je pri 80°C, a broj okretaja miješalice odmah je na početku smanjen sa 600 na 450 rpm zbog gustoće suspenzije. Zagrijavanje je trajalo 10 minuta zbog veće mase hidroksietil celuloze. Dobiven je blago mutan, bezbojan gel s jako puno mjehurića zraka. Pri ovoj koncentraciji viskoznost gela je već bila puno veća nego kod prethodnih gelova. Priprema gela s 35 g/L hidroksietil celuloze započeto je pri 80°C i 450 rpm, te je nakon 15 minuta zagrijavanja dobiven blago mutan, bezbojan gel s najviše mjehurića u odnosu na prethodne gelove. Viskoznost gela značajno je porasla, otežavajući vađenje gela iz laboratorijske čaše.

Hlađenjem gelova na sobnu temperaturu došlo je do povećanja njihove čvrstoće zbog gubitka energije koju su dobili zagrijavanjem. To je uzrokovalo stvaranje veza među molekulama hidroksietil celuloze i formiranje trodimenzionalne strukture gela unutar koje je zarobljena voda. Samo su posljednja dva gela postala polu-čvrsta, dok su preostali gelovi zadržali svojstva tekućine (slika 4).



Slika 4: Jednaki volumeni hidroksietil celuloznih gelova koncentracija 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 35 g/L ohlađeni na sobnu temperaturu i postavljeni na staklenu ploču te na par sekundi nagnuti pod kutem od 90° kako bi se pokazala njihova viskoznost.

(vlastita slika)

Za imobilizaciju bakterija među svim pripremljenim gelovima odabran je gel s 30 g/L, odnosno 3% hidroksietil celuloze. Gel s 35 g/L uzrokovao bi probleme pri miješanju i homogenizaciji stanica zbog velike viskoznosti, dok su ostali gelovi bili previše tekući i zbog toga nepogodni za imobilizaciju.

Postupak pripreme gela za imobilizaciju bakterija proveden je u aseptičnim uvjetima, kako ne bi došlo do kontaminacije. U laboratorijsku čašu od 250 mL dodano je 100 mL destilirane vode i postavljena je na ploču zagrijanu na 80°C. U čašu je namještena laboratorijska miješalica s propelerskim nastavkom. Miješanje je započeto pri 300 rpm te je postepeno dodano 3 g hidroksietil celuloze, prethodno izvaganih na analitičkoj vagi, kako ne bi došlo do nastanka grudica. Nakon 10 minuta takvog miješanja uz zagrijavanje došlo je do dobre homogenizacije, no čestice hidroksietil celuloze se nisu otopile zbog velikog volumena u kojem toplina nije bila dobro raspodijeljena. Zbog toga je čaša sa suspenzijom stavljena u vodenu kupelj temperature 100°C tijekom 5 minuta kako bi se povećala temperatura cijelog volumena suspenzije. Nakon toga je nastavljeno miješanje pri 300 rpm propelerskim miješalom, te je za 5 minuta došlo do postupnog otapanja i zgušnjavanja gela. Gel je do naciepljivanja inkubiran na 37°C u termostatu.

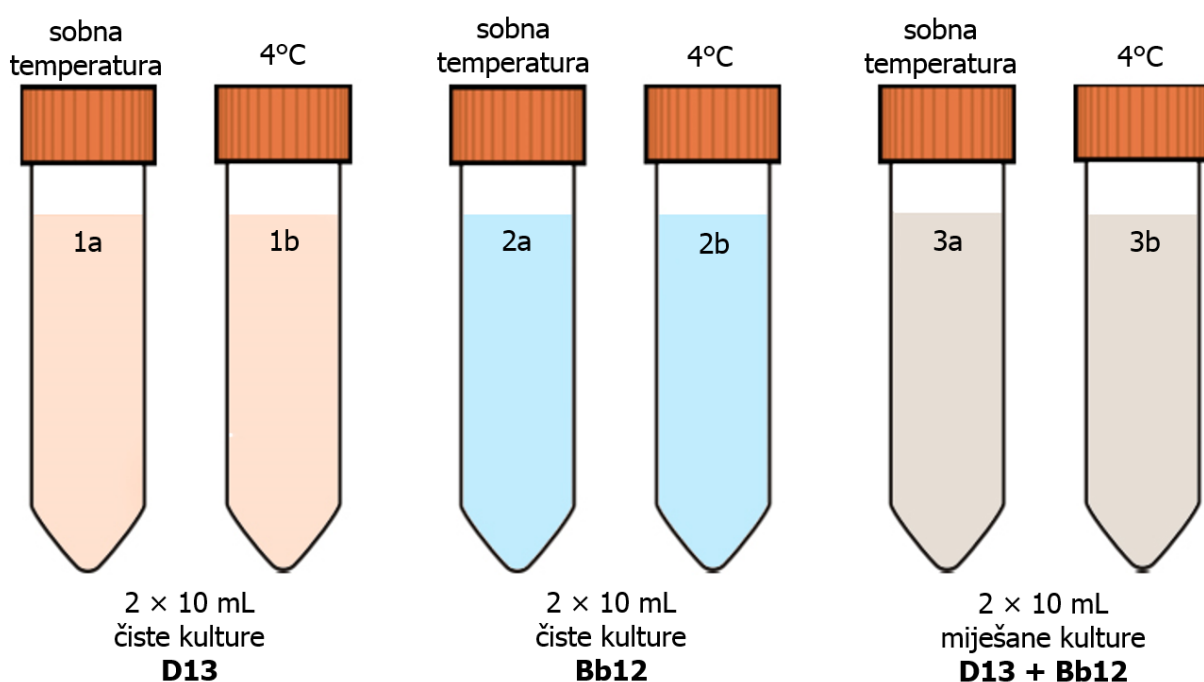
3.2.2. Priprema kultura bakterija

Dva dana prije naciepljivanja u gel, kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13 naciepljene su za prekonoćni uzgoj. Naciepljeno je po 200 µL u 5 mL MRS bujona u tri paralele za svaku kulturu, pri čemu je *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 naciepljen anaerobno. Zatim je po 2 mL tako dobivenih prekonoćnih kultura precijepljeno u 50 mL MRS bujona u tikvicama u tri paralele za još jedan prekonoćni uzgoj.

Na dan naciepljivanja u gel, prekonoćne kulture su prebačene u kivete od 50 mL te 6 minuta centrifugirane pri 4200 rpm kako bi se izdvojile stanice od hranjive podloge. Potom su odliveni supernatanti, a talozi isprani u 20 mL fiziološke otopine. Ponovnim centrifugiranjem istaložene su oprane stanice, a supernatanti su odliveni. Talog iz svake prekonoćne kulture resuspendiran je u 50 mL fiziološke otopine. Tako dobivene suspenzije bakterija raspodijeljene su u velike kivete: dvije kivete s 10 mL *Lactobacillus plantarum* D13, dvije kivete s 10 mL *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 te dvije kivete s miješanim suspenzijama koje sadrže po 5 mL *L. plantarum* D13 i 5 mL *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12. Na taj način je u kivetama dobivena koncentracija stanica jednaka prekonoćnoj kulturi, odnosno broj stanica u kiveti jednak kao u 10 mL prekonoćne kulture.

3.2.3. Nacjepljivanje bakterija u gel

Sve suspenzije stanica su neposredno prije nacjepljivanja u gel centrifugirane 6 minuta pri 4200 rpm, te su odliveni supernatanti. Gel je prije resuspendiranja stanica dodatno zagrijan na 60°C na magnetskoj miješalici, no i dalje je bio gust i stvarao problem s homogenizacijom. Talozi stanica su jedan po jedan resuspendirani svaki u svom gelu, uz miješanje staklenim štapićem kako bi se pospiješila homogenizacija i spriječilo stvaranje nakupina stanica. Nacjepljeni gelovi su razdijeljeni u ukupno 6 kiveta, tako da su dva sadržavala *L. plantarum* D13, dva *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 i dva miješanu kulturu (slika 5). Tri kivete s različitim kulturama čuvane su na sobnoj temperaturi, a preostale tri u hladnjaku na 4°C tijekom 30 dana.

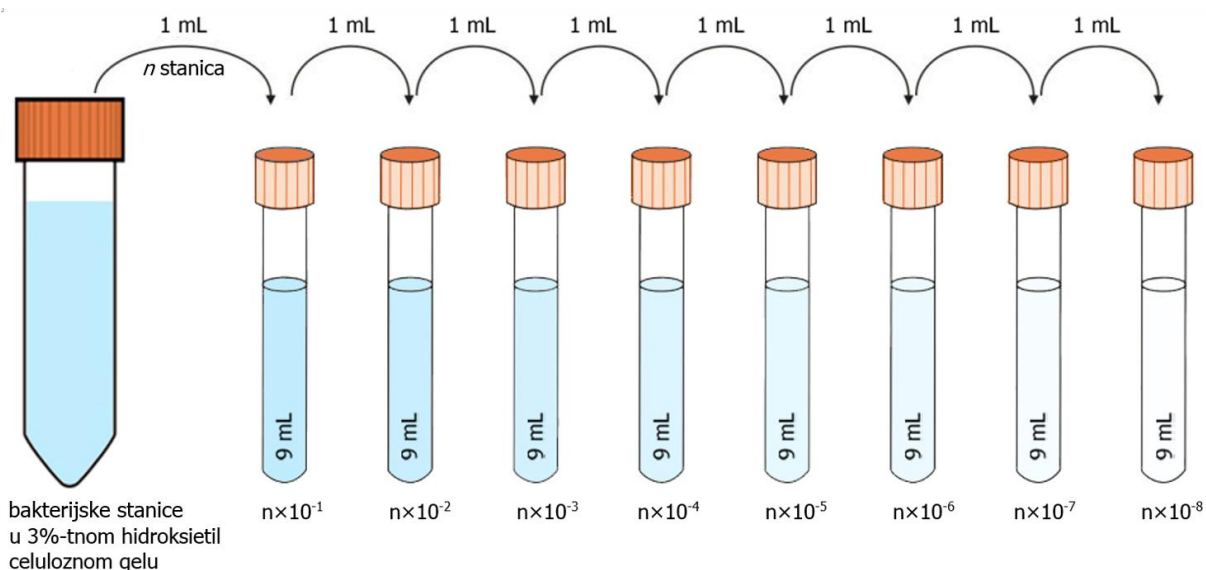


Slika 5: Prikaz kiveta s nacjepljenim gelovima čuvanim u različitim uvjetima. Kivete s brojem 1 sadrže *Lactobacillus plantarum* D13, s brojem 2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, a s brojem 3 miješanu kulturu obje bakterije. Kivete označene slovom *a* čuvane su na sobnoj temperaturi, a slovom *b* na 4°C.

(vlastita slika)

3.2.4. Određivanje broja preživjelih bakterija

Broj preživjelih bakterija u hidroksietil celuloznom gelu određivan je odmah nakon naciepljivanja, nakon 10 i nakon 30 dana čuvanja u gelu. Svi postupci provedeni su u aseptičnim uvjetima. Za svaku kivetu s gelom učinjena je serija decimalnih razrjeđenja u sterilnoj Ringerovoj otopini (slika 6). Za uzimanje 1 mL uzorka gela za 1. razrjeđenje bilo je potrebno odrezati vrh nastavka pipete zbog velike gustoće, pa volumeni uzetih uzoraka nisu bili potpuno jednaki za sve uzorke.



Slika 6: Prikaz pripreme serije decimalnih razrjeđenja do 8. razrjeđenja.
(vlastita slika)

Po 1 mL tako pripremljenih decimalnih razrjeđenja naciepljeno je na hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama i inkubirano na 37°C. MRS podloge naciepljene su razmazivanjem 1 mL razrjeđenja na ohlađenu podlogu štapićem po Drigalskom. TOS podloge s dodanim mupirocinom naciepljene su zalijevanjem 1 mL razrjeđenja otopljenom temperiranom podlogom. Razrjeđenja oba gela s *L. plantarum* D13 naciepljena su na MRS podloge, a razrjeđenja oba gela s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u TOS podloge. Razrjeđenja gelova s miješanim kulturama naciepljena su na obje podloge, kako bi se zasebno odredio broj preživjelih stanica za obje bakterije.

Broj živih stanica određen je neizravnom metodom, brojenjem broja poraslih kolonija na podlogama. Broj potrebnih razrjeđenja za pojedine gelove nakon 10 dana uzgoja određen je na temelju rezultata određivanja broja bakterija nakon naciepljivanja gela. Analogno tome određen je i broj potrebnih razrjeđenja za pojedine gelove nakon 30 dana uzgoja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu su probiotički sojevi *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13 naciepljeni u 3%-tni hidroksietil celulozni gel u 3 različite kombinacije, te su u paralelama čuvani na sobnoj temperaturi i na 4°C. Po 1 mL uzorka uzeto je odmah nakon naciepljivanja u gel, 10 dana nakon naciepljivanja i 30 dana nakon naciepljivanja. Iz uzetih uzoraka napravljena su razrjeđenja i naciepljena na odgovarajuće selektivne podloge ovisno o bakteriji čiji je broj živih stanica određivan. Nakon inkubacija podloga na 37°C brojane su izrasle kolonije za sva naciepljena razrjeđenja te su ti rezultati preračunati u ukupan broj živih stanica u 10 mL gela. Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost ukupnog broja živih stanica u 10 mL gela, uz standardnu devijaciju.

Objašnjenja oznaka u rezultatima:

- D13-S: stanice *L. plantarum* D13 iz gela čuvanog na sobnoj temperaturi
- D13-4: stanice *L. plantarum* D13 iz gela čuvanog na 4°C
- Bb12-S: stanice *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 iz gela čuvanog na sobnoj temperaturi
- Bb12-4: stanice *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 iz gela čuvanog na 4°C
- M/D13-S: stanice *L. plantarum* D13 iz miješanog gela čuvanog na sobnoj temperaturi
- M/D13-4: stanice *L. plantarum* D13 iz gela čuvanog na 4°C
- M/Bb12-S: stanice *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 iz miješanog gela sa sobne temp.
- M/Bb12-4: stanice *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 iz miješanog gela čuvanog na 4°C.

Odmah nakon naciepljivanja u gel uzeti su uzorci iz svakog gela te su napravljena razrjeđenja prema očekivanjima broja živih bakterija. Vidljivo je kako je zadovoljavajući broj bakterija preživio proces naciepljivanja i homogenizacije gela (tablica 3).

Tablica 3: Broj živih stanica određen odmah nakon naciepljivanja u hidroksietil celulozni gel. [>>] označava kako je na podlozi naraslo previše kolonija.

kultura temperatura	BROJ ŽIVIH STANICA U 10 mL GELA							
	D13 S	D13 4	Bb12 S	Bb12 4	M/D13 S	M/D13 4	M/Bb12 S	M/Bb12 4
1.	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>
2.	>>	>>	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	>>	>>	>>	>>
3.	>>	>>	$1,60 \cdot 10^4$	$1,60 \cdot 10^4$	>>	>>	$2,80 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^5$
4.	>>	>>	$1,00 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^4$	>>	>>	$4,00 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^5$
5.	$5,00 \cdot 10^5$	$9,00 \cdot 10^6$	0	0	>>	>>	$2,00 \cdot 10^6$	$3,00 \cdot 10^5$
6.	$7,00 \cdot 10^7$	$9,70 \cdot 10^7$	0	0	$1,00 \cdot 10^9$	$8,80 \cdot 10^7$	0	0
7.	$8,80 \cdot 10^7$	$9,00 \cdot 10^7$	0	0	$1,00 \cdot 10^{10}$	$4,00 \cdot 10^8$	0	0
8.	$1,12 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^8$	0	0	$1,00 \cdot 10^{10}$	$8,40 \cdot 10^9$	0	0
srednja vrijednost	$1,67 \cdot 10^8$	$7,40 \cdot 10^7$	$4,20 \cdot 10^4$	$4,20 \cdot 10^4$	$7,00 \cdot 10^9$	$2,96 \cdot 10^9$	$2,00 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^5$
standardna devijacija	$1,94 \cdot 10^8$	$3,77 \cdot 10^7$	$4,11 \cdot 10^4$	$4,11 \cdot 10^4$	$4,24 \cdot 10^9$	$3,85 \cdot 10^9$	$9,28 \cdot 10^5$	$8,16 \cdot 10^4$

Nakon 10 dana čuvanja bakterija u gelu ponovo su uzeti uzorci i napravljena razrjeđenja. Iz srednjih vrijednosti ukupnog broja živih bakterija (tablica 4) vidljivo je kako čista kultura *L. plantarum* D13 čuvana u gelu na obje temperature ima minimalan pad broja živih bakterija, za razliku od broja živih bakterija iz gela u kojem je čuvana pomiješana s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12. U tom miješanom gelu je preostalo tek 0,035% početnog broja živih stanica *L. plantarum* D13 na sobnoj temperaturi i 0,14% na 4°C. Iako izgleda kao da je broj živih stanica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 porastao nakon 10 dana u gelu na 4°C, moguće je kako je to posljedica neravnomjerne raspodjele stanica u gelu ili uzimanja različitih volumena uzorka gela zbog poteškoća koje uzrokuje gustoća pri pipetiranju. Isto vrijedi i za broj živih stanica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u miješanoj kulturi na 4°C.

Tablica 4: Broj živih stanica određen 10 dana nakon naciepljivanja u hidroksietil celulozni gel. [>>] označava kako je na podlozi naraslo previše kolonija. [/] označava grešku pri naciepljivanju zbog čega nije određivan broj stanica za označena razrjeđenja.

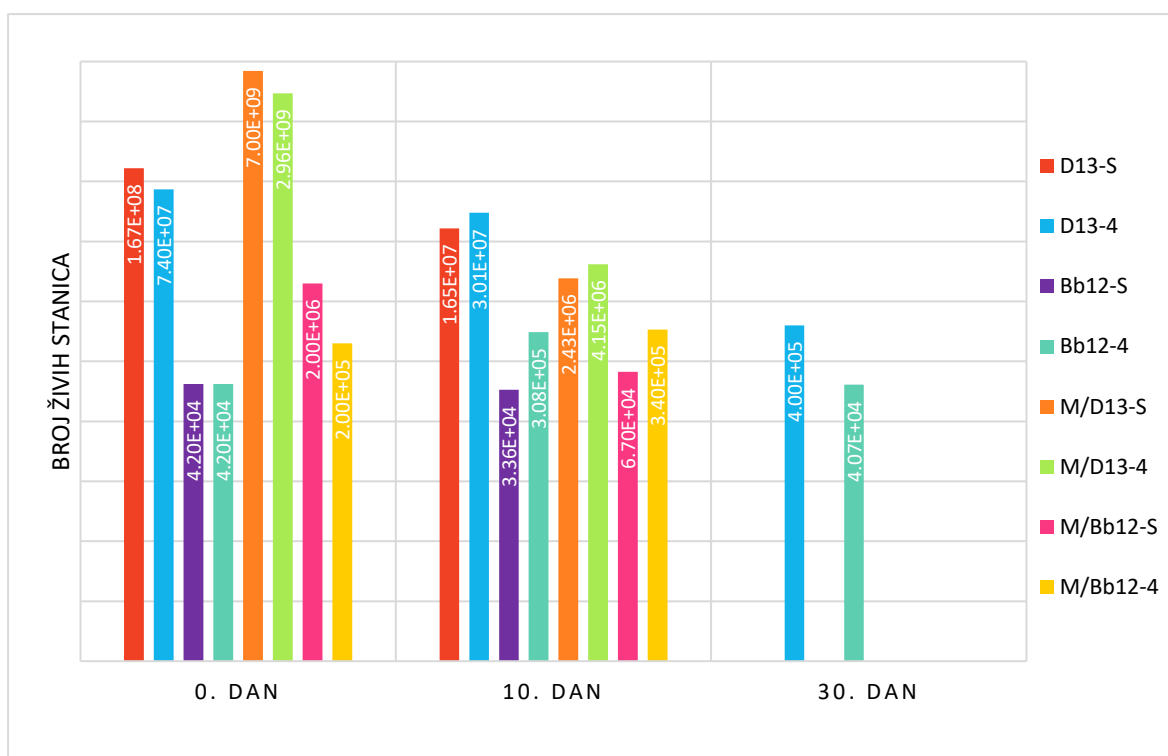
kultura temperatura	BROJ ŽIVIH STANICA U 10 mL GELA							
	D13 S	D13 4	Bb12 S	Bb12 4	M/D13 S	M/D13 4	M/Bb12 S	M/Bb12 4
1.	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>
2.	$3,61 \cdot 10^4$	>>	$1,12 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^4$	>>	>>	$3,90 \cdot 10^3$	$1,24 \cdot 10^4$
3.	$5,70 \cdot 10^4$	>>	$2,30 \cdot 10^4$	$1,90 \cdot 10^4$	$2,80 \cdot 10^4$	$4,10 \cdot 10^4$	/	$8,00 \cdot 10^3$
4.	/	>>	0	$1,00 \cdot 10^4$	$1,31 \cdot 10^6$	$4,20 \cdot 10^5$	$1,30 \cdot 10^5$	0
5.	/	$3,01 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^5$	$5,00 \cdot 10^5$	$2,40 \cdot 10^6$	$3,00 \cdot 10^5$	0	0
6.	$6,00 \cdot 10^6$	0	0	$1,00 \cdot 10^6$	$6,00 \cdot 10^6$	0	0	$1,00 \cdot 10^6$
7.	$6,00 \cdot 10^7$	0	-	-	0	$2,00 \cdot 10^7$	-	-
8.	0	0	-	-	0	0	-	-
srednja vrijednost	$1,65 \cdot 10^7$	$3,01 \cdot 10^7$	$3,60 \cdot 10^4$	$3,08 \cdot 10^5$	$2,43 \cdot 10^6$	$4,15 \cdot 10^6$	$6,70 \cdot 10^4$	$3,40 \cdot 10^5$
standardna devijacija	$2,52 \cdot 10^7$	0	$3,92 \cdot 10^4$	$3,94 \cdot 10^5$	$2,22 \cdot 10^6$	$7,93 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^4$	$4,67 \cdot 10^5$

Nakon 30 dana čuvanja bakterija u gelu došlo je do razgradnje gela s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 čuvanog na sobnoj temperaturi i oba gela s mješovitim kulturama. Ti su gelovi izgubili svoju viskoznost i čvrstoću, što znači da je bakterija *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 na neki način uspjela razgraditi strukturu hidroksietil celuloznog gela. Time je izgubljena svrha određivanja broja živih stanica u tim uzorcima, budući da se bakterije više nisu nalazile imobilizirane u gelu. Od preostalih uzoraka samo su gelovi s čistim kulturama *L. plantarum* D13 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 čuvani na 4°C zadržali dovoljan broj živih stanica tih bakterija (tablica 5).

Tablica 5: Broj živih stanica određen 30 dana nakon naciepljivanja u hidroksietil celulozni gel. [>>] označava kako je na podlozi naraslo previše kolonija.

kultura temperatura	BROJ ŽIVIH STANICA U 10 mL GELA		
	D13	D13	Bb12
	S	4	4
1.	-	-	>>
2.	-	-	>>
3.	-	-	$2,00 \cdot 10^3$
4.	-	-	$2,00 \cdot 10^4$
5.	0	$3,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$
6.	0	$4,00 \cdot 10^5$	0
7.	0	0	-
8.	0	0	-
srednja vrijednost	0	$4,00 \cdot 10^5$	$4,07 \cdot 10^4$
standardna devijacija	0	$5,00 \cdot 10^4$	$4,26 \cdot 10^4$

U usporednom grafičkom prikazu (slika 7) ukupnog broja živih stanica u 3%-tnom hidroksietil celuloznom gelu vidljivo je kako je u uzorcima Bb12-4 i M/Bb12-4 nakon 10 dana veći broj stanica nego neposredno nakon naciepljivanja. Kao što je već rečeno, to je vjerojatno posljedica greške pri homogenizaciji i uzimanju netočnog volumen uzorka, zbog čega su svi preračuni broja bakterija u originalnom volumenu gela netočni. *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 čuvana u gelu na 4°C nakon 30 dana imala je 96,99% živih stanica od svih koje su preživjele naciepljivanje. Međutim, s obzirom na probleme tijekom eksperimenta vezane uz uzorkovanje i homogenizaciju, na temelju tog rezultata ne mogu se stvarati zaključci. Od naciepljenih živih stanica *L. plantarum* D13 nakon 30 dana na 4°C preživjelo je samo 0,54% stanica, dok u gelu čuvanom na sobnoj temperaturi nije bilo živih stanica.



Slika 7: Grafički prikaz usporedbe broja živih bakterija u 3% hidroksietil celuloznom gelu određenog odmah nakon naciepljivanja, 10 dana nakon naciepljivanja i 30 dana nakon naciepljivanja. Nakon 30 dana određen je broj živih stanica samo za D13-S, D13-4 i Bb12-4 jer su bakterije u preostalim uzorcima razgradile gel.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Gel s 3% hidroksietil celuloze nije se pokazao kao dobro sredstvo za imobilizaciju probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 na sobnoj temperaturi, budući da bakterija tijekom 30 dana razgradi strukturu gela.
2. Gelovi s 3% hidroksietil celuloze u kojima su zajedno imobilizirani sojevi *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus plantarum* D13 razgrađeni su na sobnoj temperaturi i na 4°C, bez obzira na manju koncentraciju stanica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12.
3. *Lactobacillus plantarum* D13 nije pokazao dobro preživljavanje u 3%-tnom hidroksietil celuloznom gelu ni na sobnoj temperaturi niti na 4°C.
4. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 pokazao je dobro preživljavanje jedino pri imobilizaciji u 3%-tnom hidroksietil celuloznom gelu čuvanom u hladnjaku na 4°C, no da bi se mogli donijeti sigurni zaključci potrebno je ponoviti imobilizaciju pri jednakim uvjetima zbog toga što je u ovom eksperimentu došlo do greške pri homogenizaciji i uzimanju volumena uzoraka za određivanje broja živih stanica.
5. Gel s 3% hidroksietil celuloze se, na temelju dobivenih rezultata, nije pokazao kao dobro sredstvo za imobilizaciju dva navedena probiotička soja, prvenstveno zbog razgradnje i niske stope preživljavanja testiranih bakterija, ali i zbog problema oko pripreme gela i homogenizacije nakon naciepljivanja.

6. LITERATURA

Ahmed E. M., (2015) Hydrogel: preparation, characterization and applications: A review. *Journal of Advanced Research*. **6**: 105–121.

Arqués J. L., Rodríguez E., Langa S., Landete J. M., Medina M., (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International*. **2015**: 9 str.

Backhed F., Fraser C. M., Ringel Y., Sanders M. E., Sartor R. B., Sherman P. M., i sur., (2012) Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. **12**: 611–622.

Chávari M., Marañón I., Villarán M. C., (2012) Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. U: *Probiotics*. Rigobelo E. C., ur., InTech; str. 501–540.

Davidson J. N., Hirsh D. C., (1976) Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs, *Infection and Immunity*, **13**: 1773–1774.

De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J. B., Massart S. i sur., (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **107**: 14691–14696.

De Vries M. C., Vaughan E. E., Kleerebezem M., de Vos W. M., (2006) *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. **16**: 1018–1027.

Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E., Relman D. A., (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. **308**(5728): 1635–1638.

Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., Wang J., Darzi Y., Faust K, Kurilshikov A., Bonder M. J., Valles-Colomer M., Vandeputte D., Tito R. Y., i sur., (2016) Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. **352**(6285): 560–564.

Fijan S., (2016) Antimicrobial effect of probiotics against common pathogens. U: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Rao V., Rao L., ur., InTech; str. 191–221.

Franks A. H., Harmsen H. J., Raangs G. C., Jansen G. J., Schut F., Welling G. W., (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(9): 3336–3345.

Fukushima Y., Kawata Y., Hara H., Terada A., Mitsuoka T., (1998) Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology*. **42**: 39–44.

Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. **66**: 365–378.

Fuller R. (1991) Probiotics in human medicine. *Gut*. **32**(4): 439–442.

Fuller R., Gibson G. R., (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. **32**(sup222): 28–31.

Garrett W. S., (2015) Cancer and the microbiota. *Science*. **348**: 80–86.

Gilliland S. E., (1989) A review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*. **72**: 2483–2494.

Goderska K., (2012) Different methods of probiotic stabilization. U: *Probiotics*. Rigobelo E. C., ur., InTech; str. 541–550.

Goldin B. R. (1998) Health benefits of probiotics. *The British Journal of Nutrition*. **80**(4): 203s–207s.

Grice E. A., Segre J. A., (2012) The human microbiome: our second genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. **13**: 151–170.

Gu Q., Li P., (2016) Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. U: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Rao V., Rao L., ur., InTech; str. 135–148.

Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition. (2009) Rowe R. C., Sheskey P. J., Quinn M. E., ur., Pharmaceutical Press; str. 311–314.

Havenaar R., Huis in't Veld J. H. J., (1992) Probiotics: A general view. U: *The Lactic Acid Bacteria Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Wood B. J. B., ur., Elsevier Applied Science; str. 151–170.

Hawrelak J., BNat(Hons), (2013) Probiotics. U: *Textbook of Natural Medicine, 4th edition*. Pizzorno J. E., Murray M. T., ur., Churchill Livingstone Elsevier; str. 979–994.

Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J, Schillinger U., (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal for Clinical Nutrition*. **73**(2): 365s–373s.

Ibnou-Zekri N., Blum S., Schiffrin E. J., von der Weid T., (2003) Divergent Patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infection and Immunity*. **71**(1): 428–436.

Jen A. C., Wake M. C., Mikos A. G., (1995) Review: Hydrogels for Cell Immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*. **50**: 357–364.

Khalighi A., Behdani R., Kouhestani S., (2016) Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. U: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Rao V., Rao L., ur., InTech; str. 19–39.

Klemm D., Philipp B., Heinze T., Heinze U., Wagenknecht W. (1998) *Comprehensive Cellulose Chemistry*. Wiley-VCH; Volume 1

Lilly D. M., Stillwell R. H., (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. **147**(3659): 747–748.

Link-Amster H., Rochat F., Saudan K. Y., Mignot O., Aeschlimann J. M. (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **10**(1): 55–63.

Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C., (2016) The healthy human microbiome. *Genome Medicine*. **8**:51

Macfarlane G. T., Cummings J. H., (1999) Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *British Medical Journal (Clinical Research ed.)*. **318**(7189): 999–1003.

Mack D. R., Michail S., Wei S., McDougall L., Hollingsworth M. A., (1999) Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Gastrointestinal and Liver Physiology*. **276**(4): g941–g950.

Metchinkoff E., (1907) The Prolongation of Life: Optimistic Studies. William Heinmann; str. 109–133.

Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y., (2013) Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*. **2013**:716861

Molin G., (2001) Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *American Journal of Clinical Nutrition*. **73**(suppl): 380s–385s.

Navarra M. A., Dal Bosco C., Moreno J. S., Vitucci F. M., Paolone A., Panero S., (2015) Synthesis and characterization of cellulose-based hydrogels to be used as gel electrolytes. *Membranes*. **5**: 810–823.

Nobre Costa G., Miglioranza L. H. S., (2012) Probiotics: The effects on human health and current prospects. U: *Probiotics*. Rigobelo E. C., ur., InTech; str. 367–384.

Onofrei M. D., Filimon A., (2016) Cellulose-based hydrogels: designing concepts, properties, and perspectives for biomedical and environmental applications. U: *Polymer science: research advances, practical applications and educational aspects*. Mendez-Vilas A., Solano-Martin A., ur., Formatex Research Center; str. 108–120.

Oscariz J. C., Pisabarro A. G., (2001) Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*. **4**: 13–19.

- Parada J. L., Caron Ricoy C., Bianchi P., Medeiros A., Soccol C. R., (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **50**(3): 521–542.
- Parker R., (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*. **29**: 4–8.
- Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G., Gobbato N., (1995) Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science*. **78**(7): 1597-1606.
- Petersen C., Round J. L., (2014) Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiology*. **16**: 1024–1033.
- Petrovčić T., Pilipović A., (2011) Hidrogelovi. *Polimeri*. **32**(2011)1: 31–33.
- Rathod H., Mehta D. P., (2015) A review on pharmaceutical gel. *Acta Scientifica International Journal of Pharmaceutical Science*. **1**(1): 33–47.
- Rolfe R. D., (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*. **130**(suppl 2): 396s-402s.
- Sanders M. E., (2006) Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **40**: 776–783.
- Sanders M. E., Gibson G., Gill H. S., Guarner F., (2007) Probiotics: their potential to impact human health. *Council for Agricultural Science and Technology issue paper*. **36**: Listopad 2007, 20 str.
- Sanders M. E., (2008) Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*. **46**(suppl 2): 58s–61s.
- Savard P., Lamarche B., Paradis M., Thiboutot H., Laurin E., Roy D., (2011) Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 containing yoghurt on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*. **149**: 50–57.

Schriffin E. J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J. M., Donnet-Hughes A. (1995) Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **78**(3): 491–497.

Shafquat A., Joice R., Simmons S. L., Huttenhower C., (2014) Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*. **22**: 261–266.

Shah N. P., (2007) Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. **17**: 1262–1277.

Solano-Aguilar G., Dawson H., Restrepo M., Andrews K., Vinyard B., Urban J. F. Jr., (2008) Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**(20): 6338–6347.

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanić K., Matošić S., (2010) Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. **48**(3): 296–307.

Šušković J., Kos B., Matošić S., (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend. *Mljekarstvo*. **48**(3): 165–176.

Takeshita T., Matsuo K, Furuta M., Shibata Y., Fukami K., Shimazaki Y., i sur., (2014) Distinct composition of the oral indigenous microbiota in South Korean and Japanese adults. *Scientific Reports*. **4**:6990

The Human Microbiome Project Consortium, (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. **486**(7402): 207–214.

Tyakht A. V., Kostyukova E. S., Popenko A. S., Belenikin M. S., Pavlenko A. V., Larin A. K., i sur., (2013) Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications*. **4**:2469

Wilson K., Moore L., Patel M., Permoad P., (1988) Suppression of potential pathogens by a defined colonic microflora. *Microbial Ecology in Health and Disease*. **1**: 237–243.

Yatsunenko T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., Contreras M., i sur., (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. **486**: 222–227.

Zhang J., Guo Z., Xue Z., Sun Z., Zhang M., Wang L., i sur., (2015) A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *The ISME Journal*. **9**: 1979–1990.

Zhang Q., Wu Y., Fei X., (2016) Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.

Zoetendal E. G., Rajilić-Stojanović M., de Vos W. M., (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*. **57**(11): 1605–1615.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Andreja", is positioned above a horizontal line.

ime i prezime studenta